

いもち菌細胞壁の構造について

| | |
|-----|---|
| 著者 | 中島 佑 |
| 号 | 90 |
| 発行年 | 1970 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/12471 |

氏 名 (本籍)

なか
中

しま
島

たすく

佑（神奈川県）

学位の種類

農 学 博 士

学位記番号

農 博 第 9 0 号

学位授与年月日

昭和 4 6 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件

学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻

東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 農芸化学専攻

學位論文題目

いもち菌細胞壁の構造について

論文審查委員

(主 查)

教授 玉利 勤治 郎 教 授 山 下 恭 平

助教授 松田和雄

助教授 伊崎和夫

論文内容要旨

いもち菌 (*Piricularia oryzae* BRIOSI et CAVARA) は不完全菌綱 (Fungi Imperfecti), 叢生菌目 (Moniliales), 無色分生子柄科 (Moniliaceae) に属する糸状菌 (Filamentous Fungi) である。

さて微生物細胞壁に関する研究においては, 細菌細胞壁について詳しい研究がなされた反面, 酵母, 糸状菌については報告も少なく, 特に糸状菌に関しては電子顕微鏡的な観察, 細胞壁溶解酵素の研究がなされているが, 細菌で行なわれているような詳細な化学構造に関する研究はまだほとんどなされていない。化学的な研究としては, 細胞壁成分の分析という面でとどまっている。

本研究は糸状菌細胞壁の化学構造を明らかにすることが, その目的であると同時に稲いもち病の研究という側面ももっている。

そこで, いもち菌 (*P. oryzae* P₂-b) の細胞壁を電子顕微鏡的に純粋に分離し, その構成成分, 及び化学構造について, 化学的, 酵素学的方法を用いて検索した。

さらに *P. oryzae* 細胞壁成分により, *P. oryzae* の各 Race 間に差があるかどうか免疫学的手法を用いて検討した。

以下その結果を要約する。

1. いもち菌細胞壁の化学成分について

Vogel-N-sucrose-yeast extract 培地で培養した *P. oryzae* を Stationary Phase 直前に収穫し, ガラスミキサーによつて細胞を破壊後, デカンテーションと分画遠心をくり返し, 細胞壁を調製した。

このようにして得た *P. oryzae* 細胞壁は電子顕微鏡的に純粋な標品であつた。次に細胞壁の酸による分解条件を検討し, 各成分の分析を行なつた。表1及び表2にその分析値を示す。

次に *P. oryzae* 細胞壁の化学成分を Northcote らが *S. cerevisiae* 細胞壁に適用した無水エチレンジアミン (E. D) による抽出法を応用し, それに苛性ソーダによる法を組み合わせて, 分画を行なつた。その結果4区分に分けられた。すなわち, I. E. D. 可溶, 水可溶区分, II. E. D. 可溶, 水不溶区分, III. E. D. 不溶, 2N-NaOH 可溶区分, IV. E. D. 不溶, 2N-NaOH-不溶である。これらの化学的性質をX線回折, IR-スペクトル分析, 酸水解, 酵素分解により調べた結果を表3に示す。

表1 The Chemical Composition of the Cell Wall of *P.oryzae*

| Composition | (%) | Phosphate ^{c)} | |
|----------------------------|-----|-------------------------|-----|
| Ash | 4 | Hexosamine | 12 |
| Carbohydrate ^{a)} | 71 | Glucose | 62 |
| Protein ^{b)} | 4.6 | Mannose | 4 |
| Lipid | 4 | Galactose | 0.5 |

a) Total neutral carbohydrate

b) (Total N-Hexosamin, N) \times 625

c) H_2PO_3

表2 Amino acid Composition of the Cell Wall of *P.oryzae*

| Amino acid | % of Total | | |
|------------|------------|---------------|------|
| Glycine | 7.6 | Aspartic acid | 11.4 |
| Alanine | 9.5 | Glutamic acid | 7.0 |
| Valine | 5.8 | Lysine | 5.3 |
| Leucine | 4.6 | Arginine | 2.1 |
| Isoleucine | 2.7 | Phenylalanine | 3.6 |
| Serine | 5.3 | Tyrosine | 1.9 |
| Threonine | 8.6 | Histidine | 0.8 |
| Cystine | 0.8 | Proline | 9.5 |
| Methionine | 0.8 | | |

表3 Chemical Characteristics of Each Cell Wall Fractions of *P.oryzae*

| | Products of hydrolysis | Types of Polysaccharides |
|-------|--|--|
| Fra.1 | Glu. Man. Gal Aminoacids | α -linked-Hetero-Glycan -protein complex |
| Fra.2 | Glu. Man. Gal.Glu-NH ₂ Amino acids | |
| Fra.3 | Glu. (Glu-NH ₂) B-1 \rightarrow 3 oligo saccharides | β -1 \rightarrow 3 glucan |
| Fra.4 | Glu-NH ₂ Glu. | Chitin + β -1 \rightarrow 3 glucan |

エチレンジアミンにより分画された構成高分子は，さらに精製を試み，化学的性質を調べた。Fra.1区分は超遠心的，電気泳動的に均一となり，Glucose, Mannose, GalactoseよりなるHetero-glycanとProtein (or Peptide) の複合体であることがわかった。Fra.3区分は β -1 \rightarrow 3 glucanが主体をなすことがわかったが， β -1 \rightarrow 3 glucanについては，次章でくわしく化学構造を検索した。

2. いもち菌細胞壁骨格多糖の化学構造について

糸状菌や酵母細胞壁に β -1 \rightarrow 3 glucanが，その骨格多糖として存在することは，よく知られている事実であるが，未だ詳細な化学構造は知られていない。特に糸状菌においては，その報告をみない。

そこで*P.oryzae*細胞壁の β -1 \rightarrow 3 glucanを超遠心的に均一なところまで精製し，その化学構造を検索した。

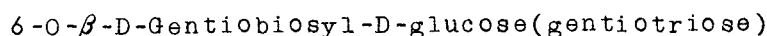
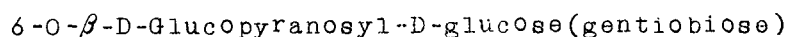
この細胞壁グルカンは，水，アルカリに不溶（可溶の部分はない。）その他溶剤に不溶で，わずかに熱ジメチルスルホキシドに膨潤する。

当グルカンを多糖構造研究の常法である，部分分解法，過沃素酸々化，メチル化分析を行ない，構造を推定した。

まず，部分分解法は，加酢分解で β -1 \rightarrow 3結合シリーズのオリゴ糖を得，Carbon Column Chromatographyで分解物を分離し，同定した。

得られた糖は，3-O- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose(Laminaribiose)，3-O- β -D-Laminaribiosyl-D-glucose(Laminaritriose)であり，結晶として同定した。

次に β -1 \rightarrow 3結合以外の糖を得ることを目的として， β -1 \rightarrow 3glucanaseを働かせて，次の β -1 \rightarrow 6結合のオリゴ糖を得た。すなわち



であり，結晶状に分離同定した。

部分分解法では， β -1 \rightarrow 3結合，及び β -1 \rightarrow 6結合よりなるグルカンであることがわかったが，次に，枝の有無，枝の長さ，分子の形につき検討するために，過沃素酸酸化，メチル化分析を行なった。

過沃素酸酸化の結果，IO₄の消費量0.36 mol/Anhydro Glucose Unit，

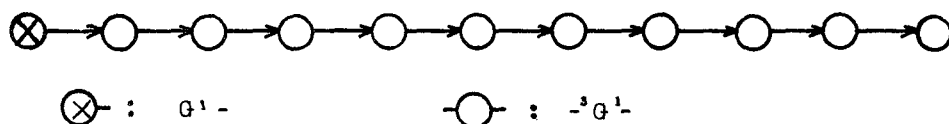
HcooHの生成量 0.18 mol/A.G.U.であることから、当グルカンは、 β -1 \rightarrow 3と β -1 \rightarrow 6結合のみを有する多糖で、非還元末端或は1 \rightarrow 6結合がグルコース残基5ないし6個に1個存在することが推定された。

次にメチル化分析の結果を表4に示す。

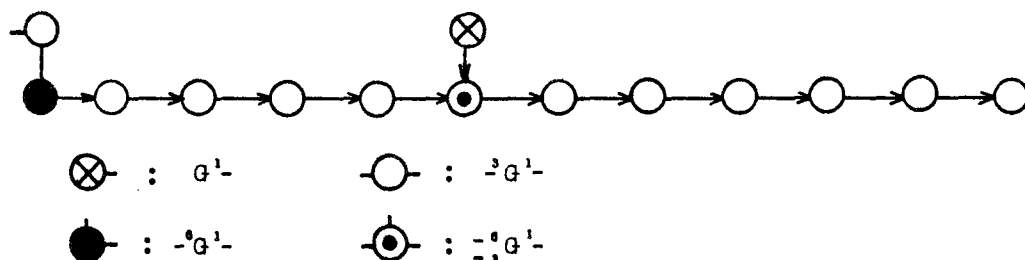
表4 Methylation Analysis of *P.oryzae* Cell Wall Glucan

| | 2.3.4.6 - Tetra-O-Me-G | 2.4.6. - Tri-O-Me-G | 2.3.4. - Tri-O-Me-G | 2.4. - Di-O-Me-G |
|-----------------|---------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Original glucan | 1 | 9 | 2 | 1 |
| Degraded glucan | 1 | 10 | 0 | 0 |

すなわちOriginalなグルカンを箱守法にてメチル化すると平行して、Original glucanを過沃素酸酸化後、スミス分解したDegraded glucanをもメチル化した。もし*P.oryzae*細胞壁グルカンが β -1 \rightarrow 3結合と、 β -1 \rightarrow 6結合だけであるものとすれば、 β -1 \rightarrow 3結合をのこして他の結合は上記処理によつてこわれてしまい、1 \rightarrow 3結合部分の構造がわかる。その結果は表4に示したとおりで、Degraded glucanの構造は直鎖の1 \rightarrow 3結合グルコース残基10個に対し、1個の非還元末端が存在することがわかった。すなわち



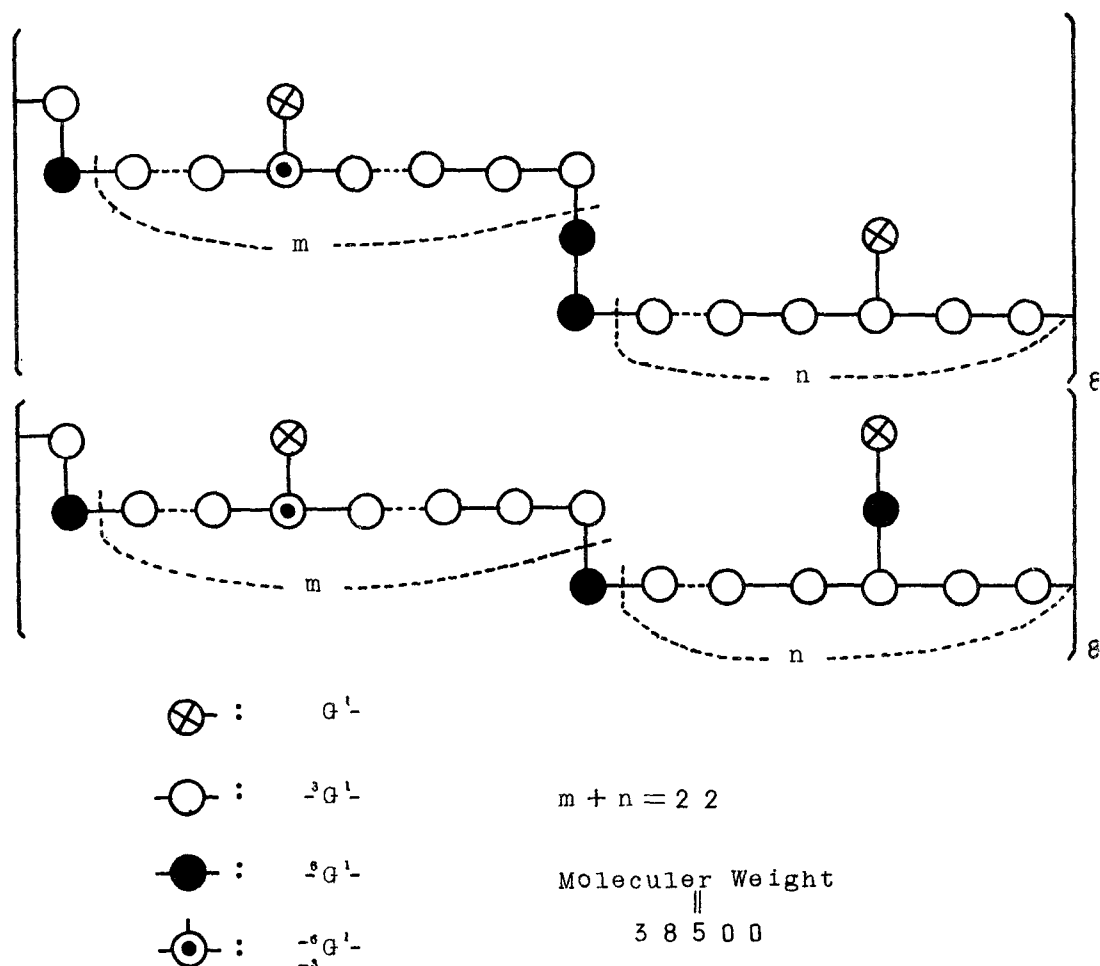
である。又、Original glucanの結果をみると、9個の1 \rightarrow 3結合、2個の1 \rightarrow 6結合、1個の非還元末端、1個の3と6で分岐した分枝結合が存在することがわかる。従つてメチル化分析の結果を総合して判断すると、下の構造となる。



次に分子量を Ballou らの方法により求めた。すなわち NaBH_4^* を用いて細胞壁グルカンの還元末端の $-\text{CHO}$ を還元し、 H^3 化アルコールとして得たものを分子量既知のオリゴ糖トリチウム化アルコールを対照として比活性を求めた。その結果、当グルカンの分子量は 38,500 となつた。

以上の結果を総合して、*P.oryzae* 細胞壁骨格グルカンの構造を推定すると、図 1 のようになる。

図 1 Chemical Structure of Cell Wall Glucan of *P.oryzae*



3. いもち菌細胞壁ヘテロ多糖の抗原性について

1 で述べた Fra.1 区分は Hetero-glycan-Protein-complex であることが証明されたが、この区分は抗原性を有する多糖であることが、ウサギに *P.oryzae* 細

胞壁を注射して得た抗いもち菌細胞壁血清と沈降反応を起こすことにより示された。

尚，その他の細胞壁構成多糖は，抗原性をもたなかつた。

そこで，現在いもち病菌研究で問題となつているいもち菌 Race 間の差が，この Heteroglycan で定量的に分離可能かどうか試みた。

その結果は，実験に供したいもち菌種間では細胞壁物質に何ら免疫的な差が見られなかつた。

総 括

いもち菌 (*Piricularia oryzae*) 細胞壁の構造について検索した。この細胞壁は主成分が多糖で 83% を占め，蛋白 4.6%，脂質 4% その他からなつている。

無水エチレンジアミンによる分画の結果， α -Heteroglycan-protein complex, β -1 \rightarrow 3glucan, chitin の 3 区分にわけられた。

α -Heteroglycan-Protein complex は電気泳動的，超速心的に均一なところまで精製され，糖区分 85% (Man:Glu:Gal=13:4.7:1)，蛋白 9% よりなることが示され，さらに抗原性を有することが明らかにされた。

螢光抗体法にて，この Heteroglycan-protein complex は細胞表層に局在することが示された。

尚，この Heteroglycan の抗原性を利用して，いもち菌 Race 間の差異を検討したが，その差は認められなかつた。

細胞壁 β -1 \rightarrow 3glucan の化学構造は詳細に検討され，図 1 のように， β -1 \rightarrow 3 グルコシド結合の back bone 12 個に対し，1 個の β -1 \rightarrow 6 による枝があり，しかも，その back bone 同志を β -1 \rightarrow 6 結合でつないでいる分子量約 38,500 の多糖であることが明らかにされた。

審 査 結 果 の 要 旨

微生物の細胞壁に関する研究は、細菌細胞壁について詳しい研究がなされた反面、酵母や糸状菌については報告も少なく、特に糸状菌に関しては電子顕微鏡的な観察、細胞壁溶解酵素の研究がなされているが、細菌で研究されているような詳細な化学構造に関する研究はまだほとんどなされていない。化学的な研究としては細胞壁成分の分析という面でとどまっている。

本研究はいもち菌細胞壁の化学構造を明らかにすることが、その目的であると同時に従来余り研究がなされていない糸状菌の細胞壁構造に関する知見を得ると言う側面ももっている。

論文は、いもち菌 (*Piricularia oryzae*) 細胞壁を電子顕微鏡的に純粋に分離し、その構成成分及び化学構造について酵素学的並びに化学的方法を用いて検討している。さらにいもち菌細胞壁成分により、いもち菌の各 Race 間に差があるかどうか、免疫学的手法を用いて検討した。その結果はいもち菌細胞壁は主成分が多糖で 83%, 蛋白 4.6%, 脂質 4%, その他からなるもので、無水エチレンジアミンによる分画の結果, α -Heteroglycan-protein Complex, β -1-3 Glucan, chitin の 3 画分に分けられた。

α -Heteroglycan-protein complex は電気泳動的、超遠心的に均一なところまで精製され、糖部分 85% (Man: Glu: Gal = 13: 4.7: 1) 蛋白部分 9% よりなることが示され、さらに抗原性を有することが明らかにされた。この Heteroglycan の抗原性を利用して、いもち菌 Race 間の差異を検討したが、その差は認められなかった。

細胞壁の骨格 β 1 \rightarrow 3 Glucan については、詳細に化学構造が検討され β 1 \rightarrow 3 グルコシド結合の主鎖、Glucose 残基 12 個に対し、1 個の β 1 \rightarrow 6 による分岐があり、しかもその主鎖同志を β 1 \rightarrow 6 でつないでいる分子量約 38500 の多糖であることが明らかにされた。

以上、本研究はいもち菌の細胞壁の構造を解明して、従来酵素分解に基づく知見しか得られていなかった糸状菌細胞壁の構造に関して新しい知見を与えたことは高く評価すべきものであり、学位を授与するに充分値するものと断定した。